

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭60-61594

⑫ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)4月9日

C 07 H 21/02  
C 12 N 15/00  
C 12 Q 1/68  
G 01 N 33/50

7252-4C  
7115-4B  
8213-4B  
Z-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 12 (全10頁)

⑭ 発明の名称 固定化RNA

⑮ 特 願 昭58-163106

⑯ 出 願 昭58(1983)9月5日

⑰ 発 明 者 ジョエル プレスラ アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19018、アルダン、  
ウエスト マグノリア アベニュー、100  
⑱ 出 願 人 ジョエル プレスラ アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19018、アルダン、  
ウエスト マグノリア アベニュー、100  
⑲ 出 願 人 イザドーラ ブロドス アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19072、ナルボッ  
キイ ト、フラット ロック ロード、1528  
⑳ 出 願 人 デビッド ジリスビイ アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19343、グレンム  
ア、メイプルフラワー ロード、ボックス 138  
㉑ 代 理 人 弁理士 河 野 昭  
最終頁に続く

明細書の抄写(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

固定化RNA

2. 特許請求の範囲

- (1) メッセージRNAが多孔性固体支持体上に固定化されていることを特徴とする病態検知、分子技術などの用途のためのメッセージRNA。
- (2) 固体支持体がそれにメッセージRNAが結合するニトロセルロース、ナイロン、ガラス繊維成いはその他の材料よりなる特許請求の範囲第1項記載の固定化メッセージRNA。
- (3) メッセージRNAを含有する全細胞成いは部分的細胞の溶液をカオトロピック(chotropic)塩中に形成し、メッセージRNAを固体支持体に結合させながらこの溶液を適当な固体支持体の濾過体中を通し、及び多孔性固体支持体から非メッセージRNAを除去することを特徴とする固定化メ

ッセージRNAの固体支持体上への配置方法。

- (4) a) 細胞を蛋白質合成の阻害剤及びリボスクレアーゼの阻害剤中において洗浄し、及び核DNAをDNAaseで劣化させ、  
b) 凍結-融解のような方法により細胞を溶解し、蛋白質を蛋白質分解酵素とのインキュベーション時に消化し、  
c) 細胞成分をヨウ化ナトリウムなどのカオトロピック(chotropic)塩の水性溶液で可溶化し、  
d) 抽出物をメッセージRNAを選択的に結合するフィルターを通して濾過し、  
e) フィルターをRNA-蛋白質結合を安定化させ、及び望ましくない汚染物質を除去する溶液で洗浄し、及び  
f) このRNAフィルターを分子交絡剤に浸し得る塩基性蛋白質及びその他の分子をアセチル化する溶液中においてインキュベートする、  
ことを特徴とする特許請求の範囲第3項記

載の方法。

- (5) カオトロピック (chaotropic) 塩としてヨウ化ナトリウムの過飽和溶液を使用する特許請求の範囲第4項記載の方法。
- (6) 過飽和溶液が25℃において少なくとも80%飽和である特許請求の範囲第5項記載の方法。
- (7) 溶液を真空、遠心分離力或いは正力下において多孔性固体支持体を通す特許請求の範囲第3項、第4項、第5項又は第6項記載の方法。
- (8) 非メッセージRNA物質が支持体から蒸留水、酸或いはアルコールで洗浄されることにより除去される特許請求の範囲第3項、第4項、第5項、第6項又は第7項記載の方法。
- (9) 固体支持体を焼いて水を除去する特許請求の範囲第3項～第8項のいずれかに記載の方法。
- (10) 特許請求の範囲第3項～第9項のいずれ

かの方法により作られた固定化メッセージRNAを有する固体支持体。

- (11) 特許請求の範囲第1項或いは第10項記載の固定化メッセージRNAを有する固体支持体よりなるDNA或いはRNAプローブにおいて、固定化RNAが分子交絡に付されたことを特徴とするプローブ。
- (12) 特許請求の範囲第1項或いは第10項記載の固定化メッセージRNAを有する固体支持体よりなる合成蛋白質において、固定化RNAが蛋白質合成に付されたことを特徴とする合成蛋白質。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は固体支持体上に固定化され、例えば癌、地中海貧血、血友病、骨髄増殖性障害、各種遺伝的障害その他の病気の表現の検出、細胞分析、遺伝子のクローニング及び分子培養テクノロジーにおける基礎的研究に有用なメッセージRNAに関する。

本発明の1つの側面によれば、メッセージ

RNAが多孔性固体支持体上に固定化されていることを特徴とする病気検知、分子バイオテクノロジーなどの用途のためのメッセージRNAが提供される。

好ましくは、固体支持体はそれにメッセージRNAが結合するニトロセルロース、ナイロン、ガラス繊維その他の材料よりなるものである。

本発明は又、メッセージRNAを含有する全細胞或いは部分的細胞の溶液をカオトロピック塩中に形成し、メッセージRNAを固体支持体に結合させながらこの溶液を適当な固体支持体の濾過体中を通し、及び多孔性固体支持体から非メッセージRNAを除去することを特徴とする固定化メッセージRNAの固体支持体上への配置方法を含むものである。

好ましい側面において、本発明は、

- a) 細胞を蛋白質合成の阻害剤及びリボスクレアーゼの阻害剤中において洗浄し、及び核DNAをDNAaseで劣化させ、

b) 凍結-融解のような方法により細胞を溶解し蛋白質を蛋白質分解酵素とのインキュベーション時に消化し、

c) 細胞成分をヨウ化ナトリウムなどのカオトロピック塩の水性溶液で可溶化し、

d) 抽出物をメッセージRNAを選択的に結合するフィルターを通して濾過し、

e) フィルターをRNA-蛋白質結合を安定化させ、及び望ましくない汚染物質を除去する溶液で洗浄し、及び

f) このRNAフィルターを分子交絡に参与し得る塩基性蛋白質及びその他の分子をアセチル化する溶液中においてインキュベートすることよりなることを特徴とする方法を含むものである。

細胞洗浄は下記の如く行うことができる。

固体組織の部換試料は少なくとも2容のPBBC (0.5 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.14 M リン酸緩衝液, pH 6.8, 2.5 µg/ml シクロヘキサミド) を添加し、ミキサーなどの

装置内で10～30秒間低速でブレンドすることにより単細胞懸濁液は細胞の小塊にすることができる。その他の細胞溶解を起こさない組織分裂を使用することもできる。単一細胞よりなる分裂細胞或いは細胞塊(血液、尿、痰、リンパ液などの試料)或いは細胞のPBBC中での実験室培養物を1000×gにおいて10分間遠心分離して細胞をペレット化する。細胞を冷PBBC中において再懸濁し、再ペレット化することができる。再懸濁緩衝液の選択は、シクロヘキサミド及び低温を用いた蛋白質合成機構を「凍結」することによる内部RNAを劣化から守らんとする願望により支配され、例えば強力なリボヌクレアーゼ阻害剤が使用される。この段階において、分面遠心、密度勾配遠心或いはその他の方法による特別の細胞型の単離を行うことができる。細胞溶解前の細胞洗浄の方法は各種方法を使用することができる。最も単純な場合において、シクロヘキサミドを試料に添加し、細胞を次いで溶解する。個々の細胞が固体組織か

ら得ることができ、又、ある種の細胞型は既存組織から分離されなければならない。

細胞溶解及び除蛋白質方法は、好ましくは次の如く行われる。洗浄細胞に1mlの20mMバナジウムリボヌクレオシド或いはその他の適当なリボヌクレアーゼ阻害剤及び20μg/mlのDNAase Iを添加する。細胞を37℃で20分間インキュベートし、100μg/mlのプロテアーゼK或いはその他の適当なプロテアーゼを添加する。細胞を溶解するために懸濁液をメタノールドライアイス浴のような低温浴内において2回凍結-融解する。この混合物を次いで蛋白質分解を可能にする温度通常37℃において保持し、RNAを1)リボヌクレアーゼがRNAを劣化させない条件下において細胞を分裂することにより、及び2)RNAに結合するか或いはRNAを「マスク」する蛋白質を除去することによりRNAを露出する。更に、本発明等は細胞溶解中のある種の除蛋白質は濾過及びRNAのフィルター

への結合を助けることを見出した。

飽和NaIを用いた細胞成分の可溶化は好ましくは次のようにして行われる。先ず、25.0gの固体NaIを100mlの温水中に添加することにより、過飽和NaI溶液が作られる。NaIは室温において溶液から晶出するが、しかしNaIは混合物を75℃に加熱することにより再溶解することができる。次いで、0.813mlの75℃に加熱した過飽和NaIを1mlの溶解されたプロテアーゼ処理細胞に添加する。NaIの最終濃度は25℃において100%飽和である。25℃において80%を超える任意の濃度のものが満足して用いることができる。25℃において80%未満の濃度も場合により使用することができるが、しかし、RNAの膜への結合及び保持(下記参照)は次善のものである。

溶解細胞の濾過は、好ましくは次のようにして行われる。NaI溶液を中程度の真空下のフィルターにゆつくり通す。この溶液は又、

流速がRNAのフィルターへの結合を排除しない限りにおいて、圧力下に押し出し、遠心力を通じて引き出し或いは1つの重力において強制して押し出すことが可能である。ニトロセルロース及びガラス繊維が満足できるフィルター材料であることが見出された。酢酸セルロースは、RNAが殆んど或いは全く結合しないので不満足である。

RNAフィルターの洗浄は好ましくは次の様にして行われる。細胞破片の多くはフィルターを通過するのに対し、RNA及びある種のDNA及びその他の分子はフィルター材料に結合する。NaI溶液が通過された後、フィルターを蒸留水で洗浄する。この洗浄はDNAリボゾームRNA、トランスファーRNA及びその他の望ましくない汚染物質を除去する傾向を有し、メッセージRNAをフィルターに固定するのを助ける。蒸留水の代わりに酸及びアルコールを使用することもできる。

RNAフィルターのアセチル化は好ましく

は次のようにして行われる。RNAフィルターを新たに調製された0.2 M トリエタノールアミン及び0.25 M アセトアルデヒドを含有する溶液中に25°Cにおいて10分間浸漬する。この工程は塩基性蛋白質をアセチル化し、分子交雑中における放射性プローブのフィルターへの非特異的付着を防止する。この工程は又、フィルター結合RNAaseを不活性化する。

更に、形成されたフィルターの貯蔵性を改良するために80°Cにおいて2時間焼いて水を除去することができる。

この固定化メッセージRNAフィルターは更に処理に付されることができ、例えば通常は放射活性クローン化DNA分子である標識化プローブへの分子交雑、固定化RNAを鋳型として用いるDNA、RNA或いは蛋白質の酵素合成などに付することができる。

多くの標準技術の任意のものをDNA或いはRNAプローブへの分子交雑に使用すること

とができる。フィルターを洗剤、蛋白質、Picoll、ポリビニルピロリドン、ポリ(A)及びDNAを含有する予備交雑化溶液中に交雑温度において数時間浸漬することができる(Jeffreys, A. J. 及び Flavell, R. A., Cell 12: 429-437, 1977)。DNAプローブのRNAフィルターへの分子交雑についての最も満足できる条件は、DNA-RNA交雑はDNA-DNA交雑よりも優先的に行われるので(Vogelstein, B. 及び Gillopie, D., BBRC 75: 1127-1132, 1977)、70~90 Mホルムアミド、0.15~0.5 M Na<sup>+</sup>、pH 6~8、37~45°C及び数時間である。交雑後、未反応プローブをRNAフィルターを交雑及び/又は予備交雑溶液と同様或いは同一の溶液に浸漬することにより除去する。プローブの交雑の程度は、フィルター上の対応するRNA配列の目安であり、ラジオオートグラフィック或いはシンチレーション計数を含むいくつかの方法の任意の方法により達成する

ことができる。全ての予備交雑洗浄工程はヌクレアーゼ活性のない溶液中で行われなければならない。メッセージRNAフィルターへのプローブの交雑の程度はメッセージRNAが得られた細胞中の遺伝子表現の程度に正比例する。例えば、プローブが放射活性ヘモグロビン遺伝子である場合には、交雑の高い割合はフィルター上への多量のヘモグロビン特異性メッセージRNAの存在を表明し、それは又RNAが生ずる細胞がヘモグロビン遺伝子を活性に表現していることを示すものである。

固定化RNAの合成のために、逆転写の幾つかの条件の任意のものを使用することができる。典型的には、(Efstratiadis, A. 及び Villa-Komaroff, Genetic Engineering 2: 15-33, 1979)、我々はRNAフィルターを100 µgの100 mM Tris、pH 8.3、10 mM Mg<sup>++</sup>、1 µgのオリゴdT、10 mMジチオスレイトール、1 mMデオキシヌクレオシドトリホスフェート(1個2Hに

より標識化)、60 mM KCl及び1単位の逆転写酵素中においてインキュベートする。フィルターはこの溶液中において37°Cで6時間インキュベートされ、その間にRNA鋳型のDNA相補体が形成され、このDNA相補体がRNA鋳型を介してフィルターに付着されて留まる。このcDNA-RNAフィルターを数回30 mM Tris-HCl、pH 7.5、4 mM MgCl<sub>2</sub>及び0.5 mM 2-メルカプトエタノール中で洗浄する。

第二のDNA鎖は次の様にして合成される(Humphries et al., Nuc. Ac. Res. 5: 905-924, 1978)。フィルターを50 µgの30 mM Tris-HCl、2-pH 7.5中に浸漬し、100°Cで5分間インキュベートする。フィルターを取り出し、溶液を37°Cに急冷し、50 µgの30 mM Tris-HCl、pH 7.5、8 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM 2-メルカプトエタノール、2 mMのデオキシヌクレオシドトリホスフェート及び5単位のE. coli DNA

ポリメラーゼ I、Fragment A を添加する。溶液を  $22^{\circ}$  で 5 時間インキュベートし、フェノールで抽出し、水に対して十分に透析し、凍結乾燥する。U 字型ヘアピンを開裂し、プラントエンドを形成するために析出物を 100 mM NaCl、50 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.5、1 mM 硫酸亜鉛及び 5 単位のエンドヌクレアーゼを含む溶液 25  $\mu$ g 中に溶解し、 $43^{\circ}$  で 2 時間インキュベートする。この溶液をフェノールで抽出し、水に対して十分に透析し、凍結乾燥する。

二本鎖 DNA にオリゴ (dc) テイルを添加するために析出物を 5 mM  $MgCl_2$ 、1 mM 2-メルカプトエタノール、0.6 mM dUTP 及び 12.5 mM Hopes - NaOH 緩衝液、pH 7.1 を含む溶液 100  $\mu$ g 中に溶解する。100 単位のターミナルトランスフェラーゼを添加し、 $37^{\circ}$  で 5 分間インキュベーション後、反応物をフェノールで抽出し、水に対して十分に透析し、凍結乾燥して  $-20^{\circ}$  に貯蔵する。

スクリーニング法に核酸プローブが利用可能であれば、何百万というクローンをスクリーニングすることができる。核酸プローブが利用可能でない場合には 100 を下るクローンをスクリーニングすることができるのみであり、時には、全くスクリーニングが不可能となる。本発明を使用することにより、クローンのスクリーニングが核酸プローブの必要性とは別である新たなクローニング操作を開発することができる。更に、新規方法は初期クローンバンクを形成する方法を実質的に改良するものである。

以下、実施例により本発明を更に説明する。

#### 実施例 I

##### RNA のガラスフィルター及びニトロセルロース

##### 膜への結合

次の実験はメッセンジャー RNA をフィルター材料に結合させる方法の能力を示すために行われたものである。組織培養内で生育したヒトの HeLa 細胞を放射性ウリジンで標識化した。

この固定化メッセンジャー RNA のテイルを有する二本鎖 DNA コピーの調製物を次いでクロン化して懸伏化、オリゴ (dc) - テイルを有するベクターにする (Humphries et al., Vuc. Ac. Res. 5 : 905 - 924, 1978)。

固定化 RNA 上における蛋白質合成の数の条件のうち任意のものを使用することができる。典型的には (Palham 及び Jackson, Eur. J. Biochem 67 : 247 - 256, 1976)、RNA フィルターを 50  $\mu$ g の小麦胚芽抽出物、30 mM KCl、0.8 mM スペルミジン、1 mM ジスレイトール、1 mM アデノシントリホスフェート、0.1 mM グアノシントリホスフェート、未標識化アミノ酸及び 5  $\mu$ g の 35S メチオニン ( $10^6$  cpm) を含む溶液 100  $\mu$ g 中において  $30^{\circ}$  で 60 分間インキュベートする。

特性の遺伝子をクローニングする技術は、興味の対象となる遺伝子の組み換えクローンをスクリーニングする方法により制限される。

放射性 RNA はこれらの細胞から通常のフェノール抽出操作により精製した。精製放射性 RNA を NaCl 中で 0.5 M にし、ポリ (A) テイルを有する RNA (殆んどメッセンジャー RNA) を吸収し、ポリ (A) テイルのない RNA (リボゾーム RNA 及びトランスファ RNA) を吸収しないカラムマトリックスであるオリゴ (dT) - セルロースのカラムに通した。ポリ (A) 含有 RNA は 0.01 M Tris、pH 9 を用いてカラムから溶出した。ポリ (A) - マイナスの RNA は 0.5 M NaCl 中のオリゴ (dT) - セルロース中を 2 回通し、いずれの場合にも吸着 RNA を選択した。ポリ (A) 含有 RNA は NaCl 中で 0.5 M にし、オリゴ (dT) - セルロースに結合し、0.01 M Tris、pH 9 中に溶出した。ポリ (A) - 含有 RNA の 80 % を越える割合が該 3 のオリゴ (dT) - セルロースカラムに結合したのに対し、結合したポリ (A) - マイナス RNA は 1 % 未満であった。

ポリ (A) - 含有 RNA 及びポリ (A) - マイ

表 1

ナスRNAをエタノールから析出し、任意の便利な緩衝液例えば 0.1 M Tris, pH 7.0 に溶解した。1つのアリコートを上記に保ち、1つを37°で60分間インキュベーションした。これらのRNA溶液を各々0.813容の75°で溶融化された過飽和NaI (2.5 g/ml H<sub>2</sub>O) と組合せた。RNA溶液をガラス繊維フィルター(Whatman GFC) 或いはニトロセルロース膜(Schleicher 及び Schuell, DA 85)を通した。これらのフィルターを次いで各種溶液で吸引により洗浄した。結果を表1に示す。

フィルター材料 及び RNA	洗 浄 条 件					
	洗浄 なし	NaI	H <sub>2</sub> O	NaI, H <sub>2</sub> O	18× SSC	18×SSC, H <sub>2</sub> O 18×SSC
ニトロセルロース						
ポリ(A) <sup>+</sup> RNA	*	*	88	86	74	55
ポリ(A) <sup>-</sup> RNA	*	*	2	1	1	2
ガラス繊維						
ポリ(A) <sup>+</sup> RNA	96	61	119	66	79	84
ポリ(A) <sup>-</sup> RNA	101	101	7	10	29	5

値=フィルターに結合した<sup>3</sup>H放射性多。

\* = 急冷のために測定せず。

18×SSC = 2.7 M NaCl, 0.27 M クエン酸  
ナトリウム, pH 7。

ポリ(A)<sup>-</sup>マイナスRNAはガラスにNaI中において結合したが、殆んどは18×SSC (1.3 M NaCl, 0.135 M クエン酸ナトリウム, pH 7) による洗浄で除去され、蒸留水によりほぼ完全な除去が達成された。ポリ(A)<sup>-</sup>マイナスRNAのニトロセルロースへの結合は最小であつた。これに對して、ポリ(A)<sup>-</sup>含有RNAは、NaI 中においてガラス或いはニトロセルロースによく結合し、結合は幾つかの洗浄方法特に蒸留水に對して比較的安定であつた。

ポリ(A)<sup>-</sup>含有RNAは上記条件下において、フィルターに有効に結合されるのに對し、ポリ(A)<sup>-</sup>マイナスRNAの殆んどは結合されないのが明らかである。我々の知る限りにおいて、ポリ(A)<sup>-</sup>含有RNAは専らメッセンジャーRNAであり、又、殆んどメッセンジャーRNAはポリ(A)テイルを有するので本実験例において行われた方法は殆んど或いは全てのメッセンジャーRNAのガラス或いはニトロセルロース

フィルターへの選択的結合を行うことができるものと結論することができる。ある種のポリ(A)<sup>-</sup>マイナスRNAがメッセンジャーRNAである程度において及びある種のポリ(A)<sup>-</sup>マイナスRNAがフィルター材料に結合する程度において、我々はポリ(A)<sup>-</sup>マイナスメッセンジャーRNAが我々が開発した条件下においてフィルター材料に結合する可能性を開いたものとして残し、且つ我々はこの可能性を本特許において包含するものである。

我々は、KI、NaClO<sub>4</sub> 或いはその他のカトロビック塩を用いても同様な結果が達成されることを期待し、我々はこれらを本発明の方法に包含するものである。ある種の目的に満足な結果は又、異つた過飽和度或いは異つたNaI濃度(過飽和度において50%飽和度を越えるもの)を用いて達成し得ることが可能であり、我々はこれらの変化も本発明の方法に包含するものである。最後に、本発明の方法にはフィルターから非合理的な量のRNA

を除去せず、且つ引続く工程に不合理に妨害しない任意の洗浄操作を含ませることが出来る。

### 実施例 I

#### 分子交雑、cDNA合成及び蛋白質合成の条件下の固定化RNAの保持

実施例 I と同様にして、Hela細胞からの<sup>32</sup>Pポリ(A)<sup>+</sup> RNAをニトロセルロース上に固定した。RNAフィルターを次いで各種条件下においてインキュベートし、標識化RNAの保持率を測定した。

RNAフィルターを分子交雑用にインキュベートした (Jeffrey, A. J. 及び Flavell, R. A. Cell 12: 429-439, 1977)。RNAフィルターを0.45 M NaCl、0.045 M NaCit 及び 20 mM バナジルリボヌクレオシド中において、65°で30分間予備洗浄し、次いで0.2 M Picoll、0.2 M ポリビニルピロリドン、0.2 M 牛血清アルブミンを含

有する同一溶液中で65°において3時間予備洗浄し、次いで50 µg/ml の低分子量サケ精子DNA、10 µg/ml ポリ(A) 及び 0.1 M ドデシル硫酸ナトリウムを含有する第二の溶液中で65°において1時間予備洗浄した。分子交雑のために予備洗浄 RNA フィルターを25 µg/ml <sup>32</sup>P DNA プローブを含有する第3の溶液中に移し、65°で20時間インキュベートした。交雑後 RNA フィルターを6回5分間後洗浄し、各洗浄はポリ(A)を含まない第3の溶液を用いて65°で行った。この交雑操作に対して60%を超える固定化RNAが残存した。

RNA フィルターをDNA合成(好ましい実施態様の説明の1部参照)の条件下において、37°において6時間インキュベートしたところ、固定化RNAの損失はなかつた(91%保持率)。

RNA フィルターを蛋白質合成の条件下(好ましい実施態様の1部参照)に、30°で60分間インキュベートしたところ固定化RNA

の損失はなかつた。

### 実施例 II

#### フィルター結合RNAの分子交雑への利用可能性

精製されたメッセージRNA (ポリ(A)-含有RNA) がフィルター材料に結合されること(実施例 I)、及び分子交雑に通常使用されている条件下において保持され得ること(実施例 2)を示したが、次に我々は少なくとも幾つかのRNAが分子交雑に利用可能であることを示すための実験を企図した。

RNAをヒトの白血病白血球から次のようにして精製した。即ち、白血球泳動により集めた白血球を25 µg/ml のシクロヘキサミドを含有するリン酸緩衝液で1度、及び25 µg/ml のシクロヘキサミドを含有する LRBB 緩衝液で1度洗浄した (LRBB = .0001 M NaCl、.0025 M MgCl<sub>2</sub>、.0025 M Tris、pH 7.5)。白血球を0.05 M Tris、pH 8、1 M ドデシル硫酸

ナトリウム、20 mM バナジルウリジン及び25 µg/ml のシクロヘキサミド中に溶解した。溶解細胞各10<sup>6</sup>に対して、1.3 g の Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を通常約45°において添加した。溶液を25°において100,000 × g で17時間遠心分離し、RNAペレットを回収した。RNAを3回エタノールから析出し、次いでポリ(A)-含有RNA及びポリ(A)-マイナスRNAを実施例 I と同様にして精製した。

ポリ(A)-含有RNA及びポリ(A)-マイナスRNAを0.813 g の75°で溶融化された過飽和NaI (2.5 g NaI + 1 ml H<sub>2</sub>O) と合一した。得られた溶液をニトロセルロース膜を通して濾過し、蒸留水で洗浄し、80°で焼いた後実施例 2 で説明した予備交雑溶液で洗浄した。このRNAフィルターを次いで50 Mホルムアミド、3 × 88 C (45C-015M H<sub>2</sub>O) 及び0.014 M クエン酸ナトリウム、pH 7)、.05 M Tris、pH 7.2、1 M ジエチルピロカボネート及び5000 cpm の放射性 (<sup>32</sup>P)

DNAプローブ中で37°で20時間インキュベートした。これらの条件は分子交雑に好ましいものである。このプローブは鳥類の骨髄芽球症ウイルスから得られた逆転写酵素、オリゴ(dT)プライマー、<sup>32</sup>P dCTP 及びその他の必要な刊行物に記載された組成物 (Efstratiadis, A. 及び Villa-Komaroff, Genetic Engineering 2 : 15-33, 1979) を用いて白血球ポリ(A)-含有RNAの相補的DNAコピーを作ることにより調製された。

交雑後にフィルターを実施例2の後交雑洗浄に説明したと同様に洗浄し、次いで各フィルターの放射性をシンチレーション係数により評価した。

表 3

	固定化核酸	
	RNA	なし
交 雑	1132	68
RNAase処理後	38	43

実施例1参照)。予備交雑洗浄液、交雑洗浄液、後交雑洗浄液及び交雑検知のためのその他の処方も又RNAが破壊されず或いはその他分子交雑に利用不可能とされない限り、同等に使用可能である。

#### 実 施 例 II

##### 直接溶解細胞から得られたmRNAのニトロセルロースへの結合

分子交雑の調製に当り、細胞からのメッセージRNAを直接フィルター上に沈積することができるならば、この状況において細胞内におけるあるメッセージRNAの量をRNAを十分に精製する費用がかかり、めんどろな作業を行うことなく決定するので明らかに有利であると思われる。メッセージRNAは塩和NaI中においてニトロセルロースフィルターに選択的に結合し、且つNaIは細胞を大きな程度で溶解するので粗製溶解物からRNA結合のための条件を見出すことが十分に合理的

数値は5回測定からのcpmで表わされた放射能。

表3からRNAを含有するフィルターについてのみ相当な交雑が起こり、交雑に関連したフィルター上の分子はRNAフィルターをRNAaseを含有する溶液中においてインキュベーションすることにより破壊することができることが分る。本例及びその他の実施例に基づいてニトロセルロースに固定化されたメッセージRNAは容易に分子交雑に利用可能であるということができると結論することができる。

おそらく、RNAを実施例1で説明したようなその他のカオトロピック塩中において、ニトロセルロースフィルターその他のフィルターに結合することにより同一の交雑結果を得ることができたものと思われる。その他の原及び/又は他の方法に精製されたRNAも又同様に有効であるものと思われる(例、

であるように思われた。次の具体例はこのことが事実であり、分子交雑に許容可能な形で結合を最大化する幾つかの重要な原理を明らかにするものである。

異つた数の遺伝子数、dm、従つて異つた量のdmメッセージRNAを有する3種の異つた細胞系統を実験室で生育し、次いでシクロヘキサミドを25 µg/mlまで添加した。細胞を0.25%のトリブシンを用いて培養フラスコから遊離させ、PBC (0.5 M NaCl, 0.14 M リン酸緩衝液、pH 6.8, 25 µg/ml シクロヘキサミド) で洗浄した。充填細胞の1/10を0.5 mlの0.5 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH 7.2中に懸濁し、20 mMにした。

細胞を37°で30分間インキュベートし、次いで100 µg/mlのプロテイナーゼKの存在下において-70°の浴中において2回凍結及び融解を行つた。溶解細胞をプロテイナーゼKで37°で30分間インキュベートした。この部分的に除蛋白された細胞溶解物を70°



表 4

細胞系	稀 釈 率				
	な し	1:1	1:3	1:9	1:24
対 照	18	13	9	20	13
Colo 320	40	61	13	14	0
Colo 321	345	327	108	61	22

で溶液化された 0.8 1 3 容満飽和 NaI (2.5 g NaI/ml H<sub>2</sub>O) を添加した。この溶液及びその飽和 NaI 中の稀釈液をニトロセルロース膜中をゆつくり通過させ、次いで RNA フィルターを蒸留水で洗浄した。この RNA フィルターを 0.25 当のアセトアルデヒドを含有する新たに調製された 0.2 M トリエタノールアミン中において 25° で 10 分間インキュベートして、RNAase を含む塩基性蛋白質をアセチル化し、次いで RNA フィルターを 80° で 2 時間乾燥した。

これらのフィルターは実施例 2 と同様に分子交雑調製のために洗浄され、実施例 2 に詳細に説明した条件を用いて dm DNA プローブに交雑した。交雑後フィルターを洗浄して未処理プローブを除去し（実施例 2）、次いでシンチレーション計数により分析した。結果を表 4 に示す。

数値は 3 倍の試料からの cpm で表わされた放射能である。対照細胞は dm 遺伝子の 1 コピーを有し、Colo 320 は dm 遺伝子の 75 コピーを有し、Colo 321 は dm 遺伝子の 325 コピーを有する。dm メッセージ RNA の量は dm 遺伝子の数に比例する。

表 4 から、交雑値は細胞内の dm メッセージ RNA の量の合理的な函数であることが判る。この実験及び数多くのその他の実験に基づいて、メッセージ RNA は細胞から直接にニトロセルロースに沈着することができ、又、

このメッセージ RNA の適当な部分おそらくは全部が分子交雑に利用可能であると結論付けることができる。我々は任意の細胞からの RNA がその様に固定化され、分子交雑に使用されることができると完全に期待している。特別の細胞型に方法を適用するために僅かの変更が必要である。例えば、ある細胞がそれらの天然生育環境から取り出された場合に、メッセージ RNA を劣化させる高い割合のリボヌクレアーゼを有する。細胞分裂前に、シクロヘキサミドは蛋白質合成を凍結し、RNA 劣化を最小にするが、ある場合にはより強い蛋白質合成阻害剤が必要である。更に、ある場合においては方法の全工程において強力な RNAase 阻害剤を含有させる必要がある。そのような阻害剤としては、塩酸ドデシルナトリウム、フェノール、パナシルリボヌクレオシド類、ジエチルスチルバミジンソチオネートなどが挙げられる。阻害剤の選択は RNAase 阻害の目的に応じて異なるのみなら

ず、又、方法の必須要件の阻害の欠除即ち例えば工程 b) における DNAase による劣化も含むものである。

上記の実施例より、本発明はある細胞試料中の特定のメッセージ RNA の量の評価する手段を与え、従つて試験細胞試料中の特定の遺伝子の表現に対する信頼性のある検定法であることが判る。我々の実験はメッセージ RNA がフィルター材料に RNA ポリ (A) テイルを介して付着していることを示した。従つて該メッセージ RNA のヘテロ重合体領域は自由に相補的 DNA、相補的 RNA 或いは蛋白質の合成における鋳型として関与し得る。

代理人 弁理士 河 野 昭

第1頁の続き

②発 明 者     イザドーラ   ブロード  
                  キイ

アメリカ合衆国   ペンシルバニア州   19072、ナルボッ  
ト、フラット   ロック   ロード、1528

②発 明 者     デビッド   ジリスビイ

アメリカ合衆国   ペンシルバニア州   19343、ゲレンムー  
ア、メイプルフラワー   ロード、ボックス   138

手 続 補 正 書 (自 発)

昭和58年10月12日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和58年 特 許 願 第 163106 号

2. 発明の名称

固定化RNA

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏 名   ジョエル   プレスラ

(ほか2名)

4. 代 理 人     〒107

住 所     東京都港区赤坂2丁目2番21号  
          第28森ビル 306号 電話583-5043

氏 名     弁護士(6689) 阿 野

5. 補正命令の日付

(自 発)

6. 補正の対象

明細書 タイプ原稿 (内容には変更ありません)

および委任状およびその訳文各1通

7. 補正の内容

別紙のとおり